



Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Kateřiny Vlčkové

Téma práce: Characterization of *Drosophila melanogaster* adenosine receptor

Předložená diplomová práce se týká výzkumu adenosinových receptorů, které jsou důležitými složkami buněčných signalizací u živočichů a člověka. Práce je předložena v anglickém jazyce a po jazykové stránce je přes drobné nepřesnosti na solidní úrovni. K formální stránce bych si dovolil poukázat na přílišnou stručnost kapitol Úvod (necelé 4 strany) a Diskuse (necelé 3 strany). Zvláště v diskusi by si práce zasloužila důkladnější rozbor. Nejobsáhlejší kapitolou je Materiál a metody a to nikoliv proto, že by autorka zvolila neadekvátně podrobný popis metod, ale proto, že metodický arsenál, který si osvojila a v práci využila je velmi bohatý. V tom vidím největší klad této práce a autorka získané zkušenosti jistě ocení ve své další kariéře. Rád konstatuji, že autorka zvládla řadu metod molekulární a buněčné biologie, od práce s nukleovými kyselinami (např. klonování DNA, konstrukce rekombinantních plazmidů, kvantitativní RT-PCR v reálném čase) přes experimentování s buněčnými kulturami (např. buněčné transfekce, imunohistochemie) až po práci s celými organismy *D. melanogaster* (selekce transgenních mušek, fluorescenční mikroskopie, atd). Jednotlivé experimenty jsou provedeny perfektně s potřebnými kontrolami a jejich výsledky jsou střizlivě a s rozmyslem intepretovány.

Z výsledkové bych zmínil optimalizaci detekce DmAdoR v buňkách *D. melanogaster*. Receptor byl úspěšně detekován v membráně buněk S2, které jej produkují s vysokou účinností, které sloužily jako pozitivní kontrola, nebyl však touto metodou zachycen v buňkách S2 s endogenní expresí DmAdoR, což naznačuje, že úroveň exprese je pod detekčním limitem dané metody. V mozku *D. melanogaster* se endogenní DmAdoR klasickými imunohistochemickými metodami a značením FlyFos rovněž detekovat nepodařilo. Úspěšné však bylo srovnání funkcí lidského receptoru A2A a DmAdoR u drozofily, kdy se prokázala jejich rozdílná citlivost k adenosinu a velmi zajímavé bylo zjištění, že exprese lidského receptoru A2A v buňkách *D. melanogaster* indukuje vznik abdominálního nádoru.

K práci mám následující dotazy a příspěvky do diskuse:

1. Při testování kvality protilátek a sledování produkce jednotlivých proteinů v buněčných systémech se obvykle používá imunoblotting. V této práci se tato metoda nepoužívala. Mělo to nějaký důvod?
2. Většina mušek se zvýšenou expresí DmAdoR v krátké době zemřela. Lze toto pozorování upřesnit? Jaký byl poměr mušek přežívajících a umírajících?
3. Adenosinový receptor je známým cílem molekul kofeinu. Která z izoform reaguje na kofein u člověka? Aktivuje se adenosinový receptor kofeinem i u drozofily a pokud ano, jsou známy fenotypové účinky této aktivace?
4. Bude se pokračovat na objasnění podstaty nádorotvorných procesů indukovaných lidským receptorem A2A u drozofily na pracovišti školitele?

Na závěr konstatuji, že diplomová práce Bc. Kateřiny Vlčkové jednoznačně splňuje kritéria kladená na práce tohoto typu - autorka prokázala dobrou orientaci v řešené problematice, zvládla řadu náročných experimentálních přístupů, prostřednictvím kterých se jí podařilo dosáhnout stanovených cílů. Z těchto důvodů práci jednoznačně doporučuji k obhajobě. Navržená známka - "velmi dobře".

V Brně, dne 7.1. 2013


prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.



15. ledna 2013

OPONENTSKÝ POSUDEK

Magisterská práce: Characterization of *Drosophila melanogaster* adenosine receptor (autor práce: Bc. Kateřina Vlčková)

Magisterská práce Kateřiny Vlčkové se týká studia adenosinového receptoru u drozofily s cílem otestování primární protilátky k adenosinovému receptoru drozofily DmAdoR, využití této protilátky a FlyFos značení pro in vivo analýzu exprese receptoru a vývoj systému pro inducibilní expresi receptoru v tkáňových kulturách.

Práce je psána anglicky, poměrně dobrou angličtinou, a to i přes občasný výskyt gramatických chyb. Rovněž se vyskytují drobné nesrovnalosti v textu, jako např. obrázek č. 8 je v textu uveden jako obrázek č. 7 a podobně, jsou to ale závady celkově nevýznamného charakteru, takže je nebudu hodnotit a ani detailněji zmiňovat. Volbou tématu a experimentálním zpracováním je práce na velmi dobré úrovni, vyzdvihla bych metodickou náročnost práce. Co se ale týče textového zpracování, tak z toho mám tak trochu rozporuplný pocit, a to z následujícího důvodu. Některé části práce byly zpracovány skvělým způsobem, týká se to především sekce Materiál a metody, která přináší relevantní informace, bez hloupě detailních informací, jak se běžně v pracích tohoto typu objevuje. Na druhou stranu sekce Úvod a Diskuze jsou střídavě až příliš a v tom vidím zásadní slabinu této práce. V Úvodu autorka sice přináší kvalitní výklad o adenosinovém receptoru, ale považuji za nešťastné, že téměř zhola nic není zmíněno o metabolismu adenosinu, adenosinové signalizaci či úloze adenosinových receptorů v nádorovém bujení, což jsou věci, které jsou nejen úzce spjaty s adenosinovými receptory, ale také s některými experimenty či závěry práce. Střídmost úvodu bych akceptovala, kdyby byla problematika plně rozvinuta v diskuzi a kontextově doplnila výsledkovou část, což se bohužel nestalo. Jedná se o výzkumně atraktivní téma, navíc práce přinesla zajímavé zjištění, že zesílená exprese lidského A2AR může být přímým důvodem pro nádorovou indukci. Proto považuji za velkou chybu, že studentka, tento aspekt, krom i dalších věcí, v diskuzi téměř vůbec nerozvinula a nabídla jen kusé informace.

Některé pasáže vyžadují lepší vysvětlení. Např. v části Inducible system v sekci Výsledky postrádám vysvětlení, z jakého důvodu bylo použítí RheoSwitch systému s ekdysonovou indukci vlastně problematické a tedy jaký je smysl záměny ekdysonové domény za estrogenovou. Vysvětlení přináší až Diskuze. Obrázek 2 by zasloužil lepší vysvětlení. Ve své stávající formě je, alespoň pro mne, nesrozumitelný. Zásadní problém jsem měla s porozuměním experimentu, který přísluší k obrázku 7. Bez relevantních informací buď v úvodu (viz. má připomínka výše) nebo přímo v příslušném odstavci, bez nastudování dodatečné literatury, těžko mohu rozumět smyslu experimentu. V obrázku je uvedena zkratka „K“. Jedná se o „kontrolu“? Autorka zmiňuje pro experiment poměrně významné výsledky z S2 buněk při „overexpresi“ receptoru, bohužel z nějakého důvodu samotné výsledky ukázány nejsou. U výsledků z Real-time PCR (viz. obr. 8) postrádám informaci, z kolika opakování byla data získána.

Využití GFP reportérového konstruktů v S2 buňkách nevykázalo žádnou fluorescenci. Autorka naznačila, že to bylo patrně proto, že konstrukt sám o sobě nebyl funkční. Vzhledem k tomu, že byl experiment úspěšně zopakován s jiným konstruktem, nepovažuji za příliš vhodné zmiňovat původní neúspěšný experiment s GFP nebo mu alespoň v textu věnovat takovou pozornost.

V části 4.2., věnované detekci DmAdoR v buněčných kulturách a mozku, je popis experimentu otestování protilátky proti DmAdoR na S2 buňkách při „overexpresi“. Bohužel není zcela jednoznačně definováno, jakým způsobem byla „overexprese“ v buňkách nastolena. Z výsledků

autorka vyvozuje, že absence signálu v buňkách bez „overexpresse“ je daná hladinou proteinu, která je pod detekčním limitem protilátky. Proto mne zajímá, jestli byla paralelně ověřována úroveň transkripce, a to jak v buňkách s „overexpressí“ a bez ní. Protože to by mohlo mnohé napovědět. Byla protilátka nejprve testována Western blotem? Na základě experimentu s S2 buňkami a in vivo experimentů autorka vyvozuje, že absence imunesignálu je daná nízkou hladinou endogenního receptoru. Dle mého názoru se ovšem jedná spíše o problém kvality protilátky. Vyplývá to z experimentu, kde bylo využito GFP zfúzované se sekvencí DmAdoR a experimentu, kde byl využit tim-gal4 driver, jak pro expresi DmAdoR, tak GFP. V obou případech nebyl detekován žádný signál na základě DmAdoR protilátky, nicméně byl pozorován signál s anti-GFP v prvním případě či v druhém případě GFP fluorescenční signál. Pokud to chápu správně, tak v prvním případě, pokud by byl DmAdoR exprimován v podlimitní hodnotě, nebylo by rovněž možno detekovat ani GFP expresi, protože se jedná o fúzní konstrukt pod kontrolou jedné regulační oblasti. V druhém případě byla exprese DmAdoR, tak GFP zajišťována stejným promotorem Timeless. Ani zde tedy není důvod, alespoň na transkripční úrovni, pro vznik rozdílů v míře exprese mezi oběma vzorky.

Navzdory mnohde sporým informacím, část 4.3.3., věnovaná křížení drozofily, je psaná příliš obšírně. Jeden příklad za všechny - stačilo by zmínit, že u homozygotního potomstva byla studována jejich vitalita a fertilita a není třeba popisovat, že tyto homozygoti vznikli křížením homozygotních rodičů, apod. Problémem rovněž je, že autorka nedodržuje pravidla psaní genotypových zápisů. Z jejich zápisů nelze přesně říci, o jaký genotyp se vlastně jedná. Dle obrázku 9 je patrné, že studované mouchy nesly mutaci Sb a rovněž, že ani zbarvení očí není divokého typu. O těchto mutacích nepadla zmínka ani v části Materiál a metody, ani ve výsledkové části. Doporučila bych uvedení schémat křížení. Při srovnávání délky vývoje mezi kmenem s konstrukty UAS-Dm/A2 a UAS-DmAdoR bylo pozorováno 12-24 hodinové zpoždění u konstruktu UAS-Dm/A2. Proto bych se chtěla zeptat, kolikrát byl tento pokus opakován. Toto zpoždění není zas tak velké, proto si myslím, že mohlo být způsobeno i jinými faktory než vlivem použitého konstruktu. Rovněž rozdíl od očekávaného poměru mezi frekvencí homozygotů a heterozygotů u UAS-Dm/A2 není zas tak velký a pokud byl pokus proveden pouze jednou, nepřisuzovala bych zjištěnému rozdílu nijak dramatický význam.

Skvělým výsledkem práce je zjištění, že lidský receptor A2A v drozofile indukuje nádorové bujení a je skutečně škoda, že studentka v diskuzi nevěnovala tomuto faktu patřičnou pozornost a že se raději zaměřovala na poměrně nepodstatné věci. Ráda bych tedy poprosila, jestli by studentka při své obhajobě mohla nastínit svou hypotetickou představu, jakým způsobem přeexpimování A2AR vede k nádorové indukci a jak toto zjištění zapadá do současné představy o úloze A2AR v progresi nádorového onemocnění.

Velmi kladně hodnotím práci pro její metodickou náročnost a pro výsledky, které byly získány, a byla bych nerada, kdyby byl tento klad práce veškerou mou kritikou zastíněn.

Závěrem – volbou tématu a experimentálními výsledky získala tato diplomová práce velký potenciál, bohužel tento potenciál nebyl zcela využit při vlastním sepsání, nicméně i přesto se jedná o kvalitní práci a proto ji vřele doporučuji k obhajobě.


Dr. Radmila Čapková Frydrychová

Laboratoř molekulární cytogenetiky
ENTÚ, Biologické centrum AVČR
Branišovská 31
České Budějovice
Email: Radmila.Frydrychova@seznam.cz